

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 1 月 29 日 (29.01.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/009099 A1

(51) 国際特許分類:
A61P 1/04, 31/00, 37/04, 37/08, 43/00

A61K 31/721,

(74) 代理人: 清水 初志, 外(SHIMIZU,Hatsushi et al.); 〒
300-0847 茨城県 土浦市 卸町 1-1-1 関鉄つくばビ
ル 6 階 Ibaraki (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/009324

(22) 国際出願日: 2003 年 7 月 23 日 (23.07.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-213305 2002 年 7 月 23 日 (23.07.2002) JP
特願2003-50739 2003 年 2 月 27 日 (27.02.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 明治乳業
株式会社 (MEIJI DAIRIES CORPORATION) [JP/JP];
〒136-8908 東京都 江東区 新砂 1 丁目 2 番 10 号
Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU,
LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ,
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 齋藤 忠夫
(SAITO,Tadao) [JP/JP]; 〒981-0943 宮城県 仙台市
青葉区 国見 6 丁目 9-8 Miyagi (JP). 北澤 春樹
(KITAZAWA,Haruki) [JP/JP]; 〒981-3213 宮城県 仙台
市 泉区 南中山 4 丁目 9-9 Miyagi (JP).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PHOSPHORYLATED DEXTRAN

(54) 発明の名称: リン酸化デキストラン

(57) Abstract: It is clarified that an immunopotential activity can be imparted to dextran, which shows no immunological activity, by chemically phosphorylating it. The phosphorylated dextran is a B cell mitogen, activates dendritic cells and induces IL-10 and IFN- γ . Thus, it is expected as being effective in preventing infectious diseases and colitis and preventing allergic diseases by maintaining the Th1/2 balance.

(57) 要約: 免疫活性を示さないデキストランを化学的にリン酸化することにより、免疫賦活活性を発揮することが明らかとなった。リン酸化デキストランはB細胞マイトジェンである他、樹状細胞を活性化し、IL-10およびIFN- γ を誘導したことから、感染症や大腸炎の予防をはじめTh1/2バランスの維持によるアレルギー症の予防効果が期待される。

WO 2004/009099 A1

明細書

リン酸化デキストラン

5 技術分野

本発明は、リン酸化デキストランを有効成分として含む免疫賦活作用を有する医薬組成物および食品組成物に関する。

背景技術

- 10 多糖中には多くの水酸基が存在するが、その一部あるいは全てにある種の置換基を導入することで、置換前の多糖には見られなかった新しい性質が現れることがある。例えば、セルロース中の水酸基の約 40%以上をカルボキシメチル基で置換したカルボキシメチルセルロース（CM-セルロース）は水に可溶となり、安定な高粘度コロイド溶液を形成するようになるため、アイスクリームやジャムなど加工食品の安定剤として使用可能となる。例えば、「ケフィール」という発酵乳の
- 15 種菌が構成するケフィール粒から分離した多糖（ケフィラン）にカルボキシメチル基を導入することで、結果として粘度が 8 倍以上になり、その粘度増強によって食品としての用途拡大が可能になった。

- この様に、多糖にある種の化学修飾を加えた誘導体が食品として注目される中で、医学分野での応用を目的とした研究も行われている。これには、多糖への置換基の導入による生理活性の増強および誘導を利用したものが多い。デキストランを硫酸化したデキストラン硫酸（分子量約 6,500、硫黄含量 16~18%）は、ヘパリン様の抗血液凝固作用を発揮し、かつ低毒性のため、現在臨床応用されている。また同多糖は、高脂血症の治療薬としての利用頻度も高い。さらにデキストラン
- 20 硫酸は、種々のウィルスに対して増殖抑制効果を持つことが古くから知られており、HIV（Human Immunodeficiency Virus；ヒト免疫不全ウィルス）に対しても増

- 2 -

殖抑制効果があることが報告され、抗 AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome ; 後天性免疫不全症候群) 薬として近年注目を集めている。また、ヘパリンやマンナン硫酸にもウィルス増殖抑制効果が認められ、デキストラン、マンナン自身には抑制効果が認められなかったとの報告 (非特許文献 1 参照) から、硫酸基

5 がその活性発現因子であると考えられている。

デキストラン硫酸と比較して、デキストランのリン酸化誘導体であるリン酸化デキストランの生理活性に関する報告はほとんど知られていない。鈴木らは、デキストラン (分子量 38,000) にホルムアミド溶液中でポリリン酸を反応させることでリン酸基を導入することにより、リン酸化デキストランを合成した (非特許

10 文献 2 参照) 。そして、その結果生成されるリン酸化デキストランがマウス腹水に移植した Sarcoma-180 固形腫瘍 (S-180) の増殖を抑制することを報告したものの、免疫活性発現に関する詳細は未だ不明である。

また、従来のリン酸化デキストランの作製方法においては、①収率が低い、②分子量 10 万以上のデキストランのリン酸化が困難である、③6 位の水酸基の半分

15 しかリン酸化されない、等の問題点があった (非特許文献 2 および 3 参照) 。

リン酸化デキストランの生理活性を解明することができれば、得られる生理活性に関する知見を基に、疾患に対して有効な医薬品ならびに食品の開発が可能となる。

<非特許文献 1>

20 Baba, M., Pauwels, R., Balzarini, J., Arnout, J., Desmyter, J., および De Clercq, E. 著、「Mechanism of inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on replication of human immunodeficiency virus in vitro.」 Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 1988 年、Vol. 85、p. 6132-6136

25 <非特許文献 2>

Suzuki, M., Mikami, T., Matsumoto, T. および Suzuki, S. 著、「Preparation and antitumor activity of o-palmitoyldextran phosphates, o-palmitoyldextrans, and dextran phosphate.」、Carbohydrate Research、1977 年、Vol. 53、p. 223-229

5 <非特許文献 3>

Whistler, RL. および Towle, GA. 著 「Preparation and characterization of polysaccharide phosphates.」、Archives of Biochemistry and Biophysics.、1969 年、Vol. 13、p. 396-401

10 発明の開示

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、リン酸化デキストランの生理活性を見出すことにある。さらに本発明は、見出される生理活性に関する知見を基に、リン酸化デキストランを有効成分として含む医薬組成物および食品組成物を提供することを目的とする。

15 本発明者らは、上記課題を解決すべく、リン酸化デキストランの生理活性の解析を行った。まず本発明者らは鈴木らの方法により、各種分子量のデキストランに化学的にリン酸基を導入することに成功した。そして、生産したリン酸化デキストランについて生理機能の解析を行ったところ、全ての分子量のリン酸化デキストランが、免疫賦活活性、具体的にはマウス脾臓細胞に対する幼若化活性を有意に誘導することを見出した。デキストラン自体には幼若化活性は全く見られな
20 かったことから、リン酸基の導入により免疫賦活活性が誘導されることが本発明者らによって初めて見出された。デキストラン硫酸がマウス B 細胞をポリクローナルに刺激する活性化因子であることは報告されているものの、デキストランのリン酸化誘導体が幼若化活性を発揮したという報告例はない。

25 また、リン酸化デキストランは B 細胞マイトジェンであり、樹状細胞を活性化することが判明した。さらに IL-10 および IFN- γ を誘導したことから、感染症、

アレルギー疾患または大腸炎の予防もしくは治療効果が期待される。従って、リン酸化デキストランを有効成分として含む組成物は、感染症、アレルギー疾患または大腸炎の予防もしくは治療のための医薬品となるものと期待される。

5 また、食と健康に関する興味が高まる中で、これらのリン酸化デキストランによる免疫賦活化作用などの生理活性の恩恵を日常の食生活により得られることは、予防医学の観点から、大変有利なことである。リン酸化デキストランを含む組成物は、感染症、アレルギー疾患または大腸炎の予防のための食品となるものと大いに期待される。

10 即ち、本発明は免疫賦活化作用を有するリン酸化デキストランを含む医薬組成物および食品組成物に関し、より具体的には、

- 〔1〕 リン酸化デキストランを有効成分として含む、免疫賦活化作用を有する薬剤、
- 〔2〕 B細胞特異的マイトジェンである、〔1〕に記載の薬剤、
- 〔3〕 免疫賦活化作用が幼若化作用である、〔1〕に記載の薬剤、
- 15 〔4〕 免疫賦活化作用がインターフェロン γ (IFN- γ) またはインターロイキン 10 (IL-10) を誘導させる作用である、〔1〕に記載の薬剤、
- 〔5〕 リン酸化デキストランを有効成分として含む、感染症、大腸炎、またはアレルギー疾患を、予防、改善または治療するための医薬組成物、
- 〔6〕 リン酸化デキストランを有効成分として含む、感染症、大腸炎、または
- 20 アレルギー疾患を、予防または改善するための食品組成物、
- 〔7〕 リン酸化デキストランと接触させることを特徴とする、細胞を免疫賦活化させる方法、
- 〔8〕 免疫賦活化が幼若化である、〔7〕に記載の方法、
- 〔9〕 免疫賦活化がインターフェロン γ (IFN- γ) またはインターロイキン 10 (I
- 25 L-10) の誘導化である、〔7〕に記載の方法、

〔10〕 細胞が脾臓細胞由来または樹状細胞由来である、〔7〕～〔9〕のいずれかに記載の方法、

〔11〕 ホルムアルデヒド溶液中でデキストランとポリリン酸を反応させることを特徴とする、リン酸化デキストランの作製方法、

5 〔12〕 加熱条件下においてデキストランとポリリン酸とを反応させる、〔11〕に記載の方法、

〔13〕 リン酸化デキストランが、以下の工程（a）から（c）を含む方法によって作製されたものである、〔5〕または〔6〕に記載の組成物、

（a）加熱条件下においてデキストランとリン酸緩衝液とを反応させる工程、

10 （b）工程（a）の反応液を凍結乾燥する工程、

（c）工程（b）の凍結乾燥試料を 100～160℃で 24 時間、加熱する工程、を提供するものである。

本発明者らは、リン酸化デキストランの機能の解析を行った結果、新たな生理活性を有することを見出した。具体的には、デキストランにリン酸基を導入することによって、免疫賦活活性が誘導されることを初めて見出した。従って本発明
15 は、リン酸化デキストランを有効成分として含む免疫賦活作用を有する薬剤を提供する。

デキストラン（dextran： α -1, 6-グルカン）とは、乳酸菌に属する *Leuconostoc mesenteroides* などによってスクロースから生成される α 1→6 結合を主体とする粘質性のグルカンを指す。一般的に、スクロース中のグルコース残基がデキストランスクラーゼの作用でプライマーに α 1→6 結合が転移されることによって合成される。これまで、数十種のデキストラン生成菌が見出されており、菌株により α 1→6 結合の含量が変動するが、一般には 65% 以上の α 1→6 結合を有するグルカン
20 をデキストランと呼ぶ。他の結合としては、 α 1→3、 α 1→2 結合が含まれるが、多くの場合、分枝として存在している。

本発明にて用いられるデキストランは市販されており、容易に入手することが可能である。また、当業者において一般的に行われる方法に従って、微生物等から調製することも可能である。

5 本発明のリン酸化デキストランにおいて、リン酸化されているデキストランの部位は、通常、6 位の水酸基であるが、リン酸化デキストランのリン酸化される部位を正確に規定することは、通常困難である。よって、本発明におけるリン酸化デキストランとしては、6 位の水酸基がリン酸化されたリン酸化デキストランに特に限定されない。また、リン酸基の導入割合（リン酸化の割合）も正確に規定することは、通常困難であることから、本発明におけるリン酸化デキストラン
10 のリン酸基導入割合は、特に制限されない。

また、免疫賦活化とは、宿主の低下した免疫応答能を賦活（活性化）または増強することを指す。免疫賦活化作用は、当業者においては通常、リンパ球の幼若化活性またはマイトジェン活性を指標とすることにより、評価することができる。より具体的には、T 細胞または B 細胞に対する幼若化活性を測定することにより、
15 免疫賦活化作用を評価することができる。この「幼若化」とは、通常は抗原やマイトジェン刺激を受けたリンパ球が芽球化反応により形態的に変化し、芽細胞の特徴を有する細胞になり、より機能的なリンパ球に変化する現象を指す。

本発明者らは、マウス脾臓細胞における CD69 の発現誘導能を解析した結果、リン酸化デキストランは CD45R 陽性の細胞集団において CD69 の発現が増強し、その
20 活性はデキストランよりも高いことを明らかにした。CD69 はリンパ球の活性化後に早期に発現される細胞表面抗原の一つである。リンパ球は活性化されると細胞表面に接着分子を発現し、それによる細胞同士や細胞周囲を取りまく物質との特異的な接着が細胞の分化、増殖、機能調節機構に重要な役割を果たしている。CD 45R は B 前駆細胞および B 成熟細胞表面上に発現する細胞表面抗原であり、この
25 結果はリン酸化デキストランが幼若化作用を有し、さらに B 細胞マイトジェンであることを示唆するものである。従って、本発明のリン酸化デキストランは免疫

賦活化作用を有し、より具体的には、マイトジェンとしての作用、または幼若化作用を有する。

また、本発明者らは、RT-PCR 法を用いて、リン酸化デキストラン刺激によるマウス脾臓細胞におけるサイトカイン遺伝子の発現解析を行い、リン酸化デキストランがマウス脾臓細胞から IL-10 (Th2 型サイトカイン)、および IFN- γ (Th1 型サイトカイン) を誘導することを明らかにした。従って、本発明のリン酸化デキストランの免疫賦活化作用として、具体的には、インターフェロン γ (IFN- γ) またはインターロイキン 10 (IL-10) を誘導させる作用を例示することができる。

また本発明は、リン酸化デキストランを有効成分として含有する、感染症、大腸炎、またはアレルギー疾患を、予防、改善または治療するための医薬組成物を提供する。本発明者らは、リン酸化デキストランの生理機能の解析を行い、リン酸化デキストランがマウス脾臓細胞に対する幼若化活性を有意に誘導することを見出した。また、リン酸化デキストランは B 細胞マイトジェンであり、樹状細胞を活性化することが判明した。さらに IL-10 および IFN- γ を誘導したことから、本発明の上記医薬組成物は、感染症、大腸炎、またはアレルギー疾患に対して、予防もしくは治療効果を有するものと期待される。

本発明における「予防」には、疾患を呈することを防ぐための予防だけではなく、治療後の疾患の再発を防ぐための予防も含まれる。本発明において予防、改善または治療の対象となる「アレルギー疾患」としては、具体的には、花粉、ダニ、ハウスダストなどに起因するアレルギー性鼻炎やアレルギー性結膜炎、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、腸管アレルギー、アナフィラキシーショック等を例示することができるが、特にこれらの疾患に限定されない。

本発明の感染症、大腸炎、またはアレルギー疾患を予防、改善または治療するための医薬組成物を使用する場合は、一般的な医薬製剤として調製される。例えば、本発明の医薬を製剤上許容しうる担体（賦形剤、結合剤、崩壊剤、矯味剤、矯臭剤、乳化剤、希釈剤、溶解補助剤等）と混合して得られる医薬組成物または

錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、トローチ剤、シロップ剤、液剤、乳剤、懸濁剤、注射剤等の製剤として経口投与または非経口投与に適した形態で処方される。

賦形剤としては、例えば、乳糖、コーンスターチ、白糖、ブドウ糖、ソルビット、血漿セルロース等が挙げられる。結合剤としては、例えば、ポリビニルピ
5 ギャク、トラガント、ゼラチン、シュラック、ヒドロキシプロピル、セルロース、シドロキシプロピルスターチ、ポリビニルピロリドン等が挙げられる。

崩壊剤としては、例えば、デンプン、寒天、ゼラチン末、結晶セルロース、炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、クエン酸カルシウム、デキストラン、ペク
10 チン等が挙げられる。滑沢剤としては、例えば、ステアリン酸マグネシウム、タルク、ポリエチレングリコール、シリカ、硬化植物油等が挙げられる。着色剤としては、医薬品に添加する事が許可されている物が使用できる。矯味矯臭剤としては、ココア末、ハッカ脳、芳香酸、ハッカ油、竜脳、桂皮末等が使用できる。これらの錠剤は、顆粒剤には、糖衣、ゼラチン衣、その他必要により適宜コー
15 ティングしても良い。

注射剤を調製する場合、必要により、pH 調製剤、緩衝剤、安定化剤、保存剤等を添加し、常法により、皮下、筋肉内、静脈内注射剤とする。注射剤は、溶液を容器に収納後、凍結乾燥等によって、固形製剤として、用時調製の製剤としても
20 よい。また、一投与量を容器に収納してもよく、また、投与量を同一の容器に収納してもよい。

本発明の感染症、大腸炎、またはアレルギー疾患等の疾患を予防、改善または治療するための医薬組成物の投与量は、剤型の種類、投与方法、被検対象（ヒトを含む哺乳動物）の歳や体重、被検対象の症状等を考慮して決定されるものであるが、成人患者では、例えば1日当たり、0.01~600mgを1~数回に分けて経口
25 与することができる。より好ましくは0.1~400mg/日、更により好ましくは1~200mg/日の投与量を例示することができる。これらの投与量は患者の体重や年齢、

投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。投与期間も、患者の治癒経過等に応じて適宜決定することが好ましい。

- また本発明は、リン酸化デキストランを有効成分として含有する感染症、大腸
- 5 炎、またはアレルギー疾患を予防または改善するための食品組成物を提供する。本発明の食品組成物として、例えば、健康食品、機能性食品、特定保健用食品、栄養補助食品、経腸栄養食品等を挙げることができるが、感染症、大腸炎、またはアレルギー疾患を予防または改善する効果を有するものであればこれらの食品に限定されない。該組成物の製造方法は、当業者にとって周知慣用技術である。
- 10 すなわち、本発明のリン酸化デキストランと食品衛生上許容される配合物を混合して、健康食品、機能性食品、特定保健用食品、栄養補助食品、経腸栄養食品等に加工することができる。例えば安定化剤、保存剤、着色料、香料、ビタミン等の配合物を上記リン酸化デキストランに適宜添加し、混合し、常法により、錠剤、粒状、顆粒状、粉末状、カプセル状、液状、クリーム状、飲料等の組成物に適し
- 15 た形態とすることができる。

- さらに本発明は、リン酸化デキストランと接触させることを特徴とする、細胞を免疫賦活化させる方法を提供する。本発明の上記方法における好ましい態様においては、免疫賦活化させたい細胞へ、本発明のリン酸化デキストランを添加し、該細胞の培養を行う。上記方法を適用可能な細胞としては、免疫組織を構成する
- 20 細胞、例えば脾臓、腸管パイエル板、鼻粘膜組織に存在するリンパ球、マクロファージまたは樹状細胞などを示すことができるが、とくにこれらの細胞に限定されない。また本発明で用いられる脾臓細胞または樹状細胞としては、マウス由来の細胞に限定されず、ヒト由来の細胞を用いることも可能である。

- 上記方法は、より具体的には後述の実施例に記載の手順に従って実施すること
- 25 ができるが、特にこの方法に制限されない。当業者においては、後述の実施例に記載の方法を適宜改変して実施することも可能である。上記方法における「免疫

賦活化」とは、より具体的には、「幼若化」または「インターフェロン γ またはインターロイキン 10 の誘導化」を示すことができる。

また、本発明は、ホルムアルデヒド中でデキストランとポリリン酸を反応させることを特徴とするリン酸化デキストランの作製方法を提供する。本発明の上記
5 リン酸化デキストランの作製方法は、前記の従来の方法を一部改良したものである。鈴木らは、デキストラン (分子量 38,000) にホルムアミド溶液中でポリリン酸を反応させることでリン酸基を導入することにより、リン酸化デキストランを合成した。本発明の方法は、鈴木らの行った従来の方法と比較して、①従来法より
10 収率が 30% 上昇した、②従来法ではリン酸化不可であった分子量 10 万以上のデキストランのリン酸化が可能になった、③従来法では 6 位の水酸基の半分しかリン酸化されなかったが、本方法では 6 位水酸基の殆どがリン酸化可能になった、等の利点を有する。

本発明の上記方法は、具体的には、下記のようにして実施することができる。

(1) 反応がより効率よく行われるように、デキストランを十分に乾燥後、まず
15 無水ホルムアミドを加え、70℃のウォーターバス中で攪拌しながら、デキストランを完全に溶かす (1 時間)。

(2) 次に、無水トリエチルアミンとポリリン酸を加え、再度 70℃でポリリン酸が完全に溶解するまで攪拌する (2 時間)

(3) その後、24 時間静置することでリン酸化反応を行う

20 (4) リン酸化デキストランは冷エタノールで沈殿し回収する

本発明の上記方法においては、好ましくは、加熱条件下においてデキストランとポリリン酸を反応させる。鈴木らの従来の方法では、この加熱工程が含まれない。そのため、出発デキストランで特に分子量の大きな成分はリン酸化することが不可能であるものと推察される。加熱工程を挟むことにより、分子量 200 万の
25 デキストランでもリン酸化させることができる。さらに、鈴木らの方法で用いられていたメタノールを、本発明の方法においては、より安全性の高いエタノール

を好適に使用することができる。これにより、医薬品および食品への応用が可能となった。

本発明の上記リン酸化デキストランの作製方法は、より具体的には、後述の実施例に記載された方法に従って実施することができるが、この方法に制限される

5 ものではない。

例えば、本発明のリン酸化デキストランは、以下の工程（a）～（c）を含む方法によって調製することも可能である。

（a）加熱条件下においてデキストランとリン酸緩衝液とを反応させる工程、

（b）工程（a）の反応液を凍結乾燥する工程、

10 （c）工程（b）の凍結乾燥試料を 100～160℃で 24 時間、加熱する工程

上記方法の工程（c）における凍結乾燥試料の加熱条件は、好ましくは 140～160℃で 24 時間であり、より好ましくは 160℃で 24 時間である。

上記方法の一例を示せば、多糖試料（デキストラン）300mg を 0.1M リン酸緩衝液（pH5.5）10ml に懸濁し、70℃に攪拌しながら加温し、完全に溶解するまで攪拌

15 する。次いで試料溶液を凍結乾燥した後、140℃～160℃で 24 時間加温する。

上記方法は、安全な試薬類によるリン酸化法を用いているため、本発明のリン酸化デキストランを含む組成物は、食品または医薬品として安全であるものと考えられる。当業者においては、後述の実施例に記載の方法（手順）を適宜改変して実施することも可能である。

20

図面の簡単な説明

図 1 は、リン酸化反応時間におけるリン酸化デキストランの陰イオン交換クロマトグラムの結果を示すグラフである。加熱条件下において、ホルムアルデヒド溶液中でデキストランとポリリン酸を反応させることにより、リン酸化デキスト

25 ランを作製した。

図 2 は、リン酸化反応時間におけるリン酸化デキストラン中のリン含量の変化を示すグラフである。

図 3 は、リン酸化デキストランのマウス脾臓細胞に対する幼若化活性を示すグラフである。白抜きはデキストラン、黒塗りはリン酸化デキストランを表す。リ
5 ポ多糖 ; 89.3***、コンカナバリン A ; 189.4*** (*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001 無刺激の対照に対する有意差)

図 4 は、リン酸化デキストランの刺激濃度による幼若化活性の変化を示すグラフである。リポ多糖 ; 79.8***、コンカナバリン A ; 247.8*** (*P<0.05、**P<0.01、***P<0.001 無刺激の対照に対する有意差)

10 図 5 は、リン酸化デキストランの幼若化活性における経時的変化を示すグラフである。*P<0.05、**P<0.01 (無刺激の対照に対する有意差)

図 6 は、リン酸化デキストランの T 細胞 (左側) 及び B 細胞 (右側) に対する幼若化活性を示すグラフである。

図 7 は、リン酸化デキストランによる樹状細胞における CD86 発現の増強を示す
15 フローサイトメトリーの結果を示す図である。

図 8 は、図 7 の続きの図である。

図 9 は、リン酸化デキストランによるマウス脾臓細胞からのサイトカイン遺伝子発現の誘導を示す写真である。レーン 1 ; 対照 (水)、レーン 2 ; デキストラン、レーン 3 ; リン酸化デキストラン

20 図 10 は、各加熱条件におけるデキストランのリン酸化反応を、陰イオン交換クロマトグラムにより計測した結果を示す図である。加熱条件下においてデキストランとリン酸緩衝液とを反応させ、反応液を凍結乾燥した後、凍結乾燥試料を 100~160℃で 24 時間、加熱することにより、リン酸化デキストランを作製した。

図 11 は、各加熱条件におけるリン酸化デキストラン中のリン含量の変化を示す
25 グラフである。加熱条件下においてデキストランとリン酸緩衝液とを反応させ、

反応液を凍結乾燥した後、凍結乾燥試料を 100～160℃で 24 時間、加熱することにより、リン酸化デキストランを作製した。

図 1 2 は、リン酸化デキストランのリン酸化反応温度による、幼若化活性の変化を示すグラフである。加熱条件下においてデキストランとリン酸緩衝液とを反応させ、反応液を凍結乾燥した後、凍結乾燥試料を 100～160℃で 24 時間、加熱することにより、リン酸化デキストランを作製した。 (* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$)

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

なお、実験には、DEXTRAN40, 000Da (和光純薬工業) および DEXTRAN 平均分子量：約 10, 500、160, 000、513, 000、2, 000, 000Da (SIGMA CHEMICAL CO., St. Louis, MO, USA) を用いた。

試験区の対照区に対する有意差は、Student's t-test を用いて検定を行った。

〔実施例 1〕 リン酸化デキストランの調製

デキストランのリン酸化は、Whistler らおよび鈴木らの方法を一部改良して行った。すなわち、デキストラン (100mg、減圧下、 P_2O_5 存在下で 24 時間乾燥させたものを用いた) を無水ホルムアミド (10ml、市販特級品にモレキュラーシーブ (4A 1/16、和光純薬工業) を加え 24 時間放置後、上清を用いた) に懸濁し、70℃のウォーターバス中でデキストランが完全に溶解するまで 1 時間攪拌した。次に無水トリエチルアミン (2ml、市販特級品に KOH カリウムペレットを加え 24 時間放置後、上清を用いた) とポリリン酸 (500mg) を加え、同様に 70℃のウォーターバス中で攪拌し、ポリリン酸を完全に溶解させた (2 時間以上)。その後、反応溶液を室温に 24 時間静置し、デキストランをリン酸化した。反応終了後、本溶液に 2 倍量の冷エタノールを加え、沈殿物 (エタノール沈殿) を遠心分離すること

- 14 -

で得た。沈殿物をミリQ水 (100ml) に溶解させ、10%NaOH 溶液で pH を 9.0 に調整し、2 日間ミリQ水に対して透析し、脱塩を行った。透析内液をロータリーエバポレーターで濃縮後、凍結乾燥し、「粗リン酸化デキストラン」を得た。

さらに、粗リン酸化デキストランを 20mg/ml の濃度で 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH8.6) に溶解し、HiTrapQ HP (1.6×2.5cm, Amersham Pharmacia Biotech UK, Buckinghamshire, England) による陰イオン交換クロマトグラフィーに供した。カラムはカラム容量の 5 倍量の 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH8.6) で洗浄後、0-1.0M NaCl 溶液でグラジエント溶出した。溶出画分はフェノール硫酸法により中性糖をモニターし、溶出曲線により吸着成分を回収した。本画分を 2 日間ミリQ水に対して透析し脱塩を行った。透析内液をロータリーエバポレーターで濃縮後、凍結乾燥し、「精製リン酸化デキストラン」を得た。以下に、陰イオン交換クロマトグラフィーの条件を示す。

陰イオン交換クロマトグラフィー

| | | |
|----|-----|-----------------------------------|
| 15 | カラム | HiTrap Q HP (1.6×2.5cm) |
| | 移動相 | 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH8.6) |
| | 溶出 | 同緩衝液中の 0-1.0M NaCl によるリニアグラジエント溶出 |
| | 流速 | 5.0ml/min |
| | 検出 | フェノール硫酸法 (490nm, 中性糖) |

20

各分子量のデキストラン (分子量約 1 万, 4 万, 16 万, 51 万および 200 万) は、陰イオン交換クロマトグラムを用いて、ほぼ 100%のデキストランがリン酸化されていることを確認した。

25 〔実施例 2〕 デキストランの経時的リン酸化

デキストランのリン酸化における至適条件を決定する目的で、デキストラン(分子量 200 万)のリン酸化を経時的に比較し、至適反応時間を検討した。リン酸化反応は 0、6、12、24、36、48 および 72 時間について行った。リン酸化未処理のデキストランを陰イオン交換クロマトグラフィーに供したところ、全て素通り画分に溶出した。経時的リン酸化は、リン酸化反応溶液にポリリン酸が完全に溶解した時間を、反応 0 時間とし、以後 72 時間まで経時的にリン酸化を行った。

その結果、反応 0 時間においても全体の約 9 割の量のデキストランが陰イオン交換カラムに吸着した。また、反応 6、12、24、36、48、72 時間では、ほぼ 100% のデキストランがカラムに吸着した(図 1)。しかし、6~72 時間までデキストランの吸着量が同程度であったため、陰イオン交換クロマトグラムから至適反応時間を決定するまでには至らなかった。

〔実施例 3〕 リン酸化デキストラン中のリン含量

そこで、各反応時間におけるデキストランのリン酸化効率を、リン酸化デキストラン中のリン含量を測定し、至適反応時間を決定した。

リン酸化デキストラン中に含まれるリンの重量は、Dittmer らの方法に従って定量した。すなわち、1ml のリン酸化デキストラン溶液(1mg/ml)を試験管に採り、 N_2 ガスを噴霧しながら 60℃ 下で乾固した。0.4ml の 70%過塩素酸を添加し、試料が透明になるまで約 20 分間加熱した。分解終了後、室温まで冷却し、2.4ml のモリブデン酸アンモニウム試薬(特級モリブデン酸アンモニウム 4.4g を 200-300ml の蒸留水で溶解し、これに精密分析用硫酸 14ml を添加後、1000ml としたもの)、および 2.4ml の還元試薬(Fiske&Subbarow 還元試薬:無水亜硫酸水素ナトリウム 30g、無水亜硫酸ナトリウム 6g、および 1, 2, 4-アミノナフトールスルホン酸 0.5g を乳鉢で磨砕混合したものを 250ml の蒸留水で溶解し、3 時間暗所に放置後ろ過し、褐色瓶に保存。これを 1:12 に希釈して使用した)を添加混合後、100℃、10 分間加熱した。放冷後 830nm の吸光度を測定した。試料中に含まれるリンの重量

は、リン酸二水素カリウムを用いて作成した検量線により算出した。各リン酸化デキストラン中のリン含量を図2に示す。

その結果、反応0時間においてリン含量は約1.0%と最も低い値を示した。その後、反応時間の増加に伴いリン含量は次第に上昇し、反応48時間で約1.7%と最も高い値を示した。また、72時間では約1.3%とリン含量が減少した。

リン酸化デキストラン中のリン含量の値はリン酸化効率の指標であるため、リン酸化の至適反応時間をリン含量が最も高い値を示した48時間と決定した。

〔実施例4〕 マウス脾臓細胞の調製

- 10 免疫細胞の調製は、Specific pathogen free (SPF) BALB/c マウス (Japan SLC, Shizuoka, Japan) を用い検討した。マウスは5週齢の雄を購入し、マウス・ラット用の実験飼料であるMRブリーダー (日本農産工業) および蒸留水を自由摂取させ、実験には6~10週齢のマウスを用いた。

- 15 BALB/c マウスをエーテルで麻酔後、脱血屠殺した。脾臓を摘出し、ストレプトマイシン・ペニシリン (400mg, 400U/ml) を含むリン酸緩衝液 (PBS-4xS. P, pH7.3) 中で洗浄、脂肪組織などを除去した。脾臓をガーゼ中で良くほぐし、脾臓細胞をPBS中に漏出させ、細胞浮遊液を調製した。細胞懸濁液を遠心分離 (300xg, 4℃, 5分間) 後、上清を除去し、RPMI-1640 培地 (SIGMA) に再懸濁した。スチールメッシュに通し、凝集細胞を除いた後、再び遠心分離 (300xg, 4℃, 5分間)、上清
20 を除去し、最終的に2%牛胎児血清 (FCS: Biocell Lab., Inc., CA, US) を含むRPMI-1640 に再懸濁した。細胞はトリパンブルー染色法により生細胞数を計数し、これを脾臓細胞懸濁液とした。

〔実施例5〕 リン酸化デキストランのマウス脾臓細胞に対する幼若化活性

- 25 96穴マイクロプレート (SUMITOMO BAKELITE CO., LTD. Tokyo, Japan) の各穴に細胞懸濁液を 2×10^5 cell/well になるように播き、デキストランおよび実施例

- 17 -

1で調製した5種類のリン酸化デキストラン（分子量約1万、4万、16万、51万および200万）をそれぞれ100 μ g/mlになるように添加し、RPMI-1640 培地（2% FCS）中で5%CO₂下、37℃、48時間培養した。陽性対照試料として、リポ多糖（LPS: B-cell mitogen, *E. coli* 0111:B4, SIGMA）、またはコンカナバリン A（ConA: T-cell mitogen, SIGMA）を用い、それぞれ最終濃度が20 μ g/ml および2 μ g/ml になるように添加した。培養終了16時間前に、Methyl-³H-thymidine (³H) TdR, Amersham Pharmacia Biotech) を9.25kBq/well 添加し、パルスラベルした。培養終了後、セルハーベスター（LABO MASH LM 101- 655, LABO SCIENCE CO., LTD. Tokyo, Japan）を用いて細胞をガラスフィルター（LABO MASH LM 101- 10, LABO SCIENCE CO, LTD）上に回収し、ドライヤーで乾燥させた。ガラスフィルターを専用バイアルに入れ、液体シンチレーター用カクテル（POPOP: 1, 4-bis- [2- (5-phenyloxazolyl)] benzen（同仁化学研究所、熊本、日本）0.1g および DP0: 2, 5-Diphenyloxazole（同仁科学研究所）4.0g を1L のトルエンに溶解した）3ml を加え、リンパ球内に取り込まれた ³H) TdR の量を液体シンチレーションカウンター（LS1801, Beckman Coulter, Tokyo）で測定した。

また、リンパ球幼若化活性は細胞の ³H) TdR の取り込み量から、以下の式を用いて Stimulation Index (S. I.、刺激指数) を算出し相互評価した。

$$S. I. = [(\text{counts per minute in treated}) - (\text{counts per minute in background})] / [(\text{counts per minute in control}) - (\text{counts per minute in background})]$$

さらに、同時に対照として用いた LPS および ConA の S. I. 値を検討し、細胞の反応性および幼若化試験の適性を確認した。

その結果、全ての分子量において、リン酸基の導入により、デキストランのマウス脾臓細胞に対する幼若化活性が有意に誘導された（図3）。中でも分子量4万のリン酸化デキストランが S. I. =4.5 と最も高い値を示した。

〔実施例6〕 リン酸化デキストランのリンパ球幼若化特性

1) 幼若化作用における刺激濃度の検討

実施例 5 と同様にリン酸化デキストランのマウス脾臓細胞に対する幼若化活性を測定した。ただし、リン酸化デキストランを 100ng/ml、1 μ g/ml、10 μ g/ml、100 μ g/ml および 200 μ g/ml になるように添加し、5%CO₂ 下、RPMI-1640 (2%FCS) 培地中で 37℃、48 時間培養後、Methyl-^{[3]H}-thymidine の取り込み量を測定した。幼若化活性は放射活性から、対照に対する S. I. 値を算出し評価した。

その結果、10-500 μ g/ml の濃度でリン酸化デキストランは有意に活性を誘導し、500 μ g/ml で S. I. =13. 9 と最も高い活性を示した (図 4)。

10 2) 幼若化作用における培養時間の検討

実施例 5 と同様にリン酸化デキストランのマウス脾臓細胞に対する幼若化活性を測定した。ただし、培養は 200 μ g/ml 濃度で、12、24、48、72 および 120 時間行い、それぞれ培養終了 16 時間前に Methyl-^{[3]H}-thymidine を 9. 25kBq/well 添加し、パルスラベルした。培養後 Methyl-^{[3]H}-thymidine の取り込み量を測定した。幼若化活性は放射活性から、対照に対する S. I. 値を算出し評価した。

その結果、培養 24 時間目から有意な活性が誘導され (図 5)、培養 48 時間で S. I. =6. 9 と最も高い活性が認められた。その後活性は減少し、120 時間ではコントロールと同程度であった。

20 3) リン酸化デキストランの T および B 細胞に対する幼若化活性

実施例 4 で調製したマウス脾臓細胞懸濁液を細胞分離用バッファー (0. 5% BSA, 2mM EDTA/-PBS) で遠心洗浄 (2, 500rpm, 4℃, 5min) 後、細胞 3 \times 10⁷cells を 20 倍希釈したビオチンラベル抗マウス CD45R 抗体 50 μ l (CLTAG Lab, Burlingame, CA) で 4℃、15 分間インキュベートした。細胞分離用バッファーで遠心洗浄 (2, 500rpm, 4℃, 5min) 後、上清を除去し、30 μ l の 10 倍希釈ストレプトアビジン-マイクロビーズ (Miltenyi Biotec GmbH, Germany) を加え、4℃、15 分間インキュベート

した。細胞分離用バッファーで遠心洗浄 (2, 500rpm, 4℃, 5min) 後、同バッファーに再懸濁し、ナイロンメッシュに通すことで凝集細胞を除去した。同細胞懸濁液を磁気細胞分離システム (MACS; Magnetic Cell Sorting System, Miltenyi Biotec GmbH) に供し、ポジティブセレクション用カラム (MS⁺/RS⁺, Miltenyi Biotec GmbH) に 2 回通し、吸着画分を B 細胞、素通り画分を T 細胞とした。FACS を用いてそれぞれの割合を解析したところ B 細胞は分画前は 19.3% であったが、分画後は約 90% と高まり、効率よい分離が出来た。また、分画後の T 細胞の割合は約 97% であった。

得られた細胞を遠心分離により回収し、RPMI-1640 (10%FCS) に再懸濁後、上述した方法によって幼若化活性を測定した。ただし、リン酸化 NPS の刺激は 100 μ g/ml 濃度で行い、培養は 48 時間で行った。その結果、T 細胞マイトジェンである ConA、および B 細胞マイトジェンである LPS は、それぞれ特異的に T および B 細胞を活性化する結果が得られ、分画細胞を用いた本試験の適性が確認された。一方、リン酸化デキストラン (100 μ g/ml) の幼若化活性は、B 細胞のみに認められ、その S. I. 値は 13 であった (図 6)。このことから、リン酸化デキストランは B 細胞マイトジェンであることが明らかとなった。

〔実施例 7〕 リン酸化デキストランによるマウス脾臓細胞における CD86 の発現誘導

マウス脾臓細胞を、24 穴マイクロプレート (SUMITOMO BAKELITE CO., LTD. Tokyo, Japan) に 1 穴あたり 500 μ l 中に 4×10^6 cells/well となるように分注した。リン酸化デキストランを 200 μ g/ml となるように添加し、5%CO₂ 下、37℃で 24 時間培養した。なお、培地は RPMI-1640 (10%FCS 含む) を用いた。培養後、遠心分離 (2400rpm, 4℃, 5min) により細胞を回収し、FACS washing buffer (2%FCS, 0.01%NaN₃を含む PBS) で遠心洗浄 (2400rpm, 4℃, 5min) した。細胞表面抗原の同定は、抗 CD69 抗体および抗 CD86 抗体を用いた抗体染色法により行った。すなわち、細胞の

- 20 -

ペレットに抗体の組み合わせにより、20 倍希釈 PE 標識抗マウス CD86 抗体 (CALTAG)、20 倍希釈 FITC 標識抗マウス CD8 抗体 (Serotec Ltd., Kidlington, UK)、20 倍希釈 Biotin 標識抗マウス CD11c 抗体 (CALTAG) を各種組み合わせにより加え良く混合し遮光下で室温、15 分間反応させた。FACS washing buffer で遠心洗浄 (2400rpm, 4℃, 5min) し、10 μ l の 100 倍希釈 Streptavidin PE-Cy5 (Bioscience, San Diego, CA, USA) を加え、遮光下で室温、15 分間反応させた。抗体染色した細胞は FACS washing buffer で遠心洗浄 (2400rpm, 4℃, 5min) を行った。1 時間パラホルムアルデヒドで固定後、1ml のシース液 (Facs Flow, Becton, Dickinson, MA, USA) に懸濁し、ナイロンメッシュを通した後、FACS caliber™ Model 3A (Becton) により、細胞表面への抗体結合量を解析した。

リン酸化デキストランについてマウス脾臓細胞における CD86 の発現誘導を、フローサイトメトリーにより解析を行った結果 (図 7 および図 8)、リン酸化デキストランは CD8⁻CD11c⁻ (CD8⁺T 細胞および DC 以外の細胞集団 ; R2)、CD8⁻CD11c⁺ 樹状細胞 (R3 の細胞集団)、CD8⁺CD11c⁺ 樹状細胞 (R4 の細胞集団)、CD8⁺CD11c⁻ (CD8⁺T 細胞集団 ; R5) の細胞集団全てにおいて、CD86 の発現増強を示した。特に、その活性は CD8⁻CD11c⁺ 樹状細胞で顕著であった。

〔実施例 8〕 リン酸化デキストランによるマウス脾臓細胞におけるサイトカイン誘導

RT-PCR 法により、リン酸化デキストラン刺激によるサイトカイン遺伝子の発現解析を行った。

マウス脾臓細胞懸濁液を 24 穴マイクロプレートに 1 穴当たり 500 μ l の系で 4×10^6 cells/well になるように分注した。デキストランおよびリン酸化デキストランを 200 μ g/ml となるように添加し、5%CO₂ 下、37℃、12 時間培養した。

浮遊細胞を 1.5ml チューブに回収し、遠心分離 (300xg, 4℃, 5min) により上清を除去した。付着細胞はプレートの各ウェルに TRIzol reagent (GIBCO BRL, Grand i

- 21 -

sland, N. Y) 1ml を注ぎ、5 分間室温に放置後、ピペッティングすることで細胞溶解液を回収した。同溶液を浮遊細胞のペレットに加え、良くピペッティングし、完全に細胞を溶解させた。室温に 5 分間放置後、200ml のクロロホルムを加え、激しく攪拌し、3 分間放置した。遠心分離 (15, 000xg, 4℃, 15min) 後、水層を新しいマイクロチューブに回収した。500ml のイソプロピルアルコールを加えて良く攪拌し、室温で 10 分間放置後、遠心分離 (15, 000xg, 4℃, 15min) し、上清を除去した。冷 75%エタノール (RNase free) で洗浄後、エタノールを乾燥させ、最終的に 30ml の DEPC-H₂O に溶解し、RNA サンプルとした。

RT-PCR は RobusT RT-PCR (第一化学薬品、東京) を用いて行った。すなわち、
10 マウス脾臓から調製した Total RNA をテンプレートとし、Oligo dT プライマー (p d (T) 12-18) およびマウス β -アクチン、IL-7、IL-10、IL-12p40、IFN- γ および TNF- α プライマーを用いて表 1 の条件で RT-PCR を行った。

- 22 -

表 1

RT-PCR の反応溶液

| | |
|--|-------------|
| Roubs T 反応バッファー | 1 μ L |
| 50mM MgCl ₂ | 1.5 μ L |
| dNTP ミックス(各10mM) | 1 μ L |
| Template RNA | 500ng |
| forwardプライマー(10 μ mol) | 1 μ L |
| Reverseプライマー(10 μ mol) | 1 μ L |
| AMV 逆転写酵素 | 1 μ L |
| DNAポリメラーゼ | 2 μ L |
| DEPC-treated water(全量が50 μ Lとなるように加える) | |

RT-PCR反応

| | | |
|------|-----|------|
| 42°C | 30分 | |
| 94°C | 5分 | |
| 60°C | 5分 | |
| 94°C | 15秒 | 30 回 |
| 60°C | 15秒 | |
| 72°C | 30秒 | |
| 72°C | 10分 | |
| 4°C | 保持 | |

用いたサイトカインプライマーの配列を表 2 に示す。

表 2

| サイトカイン | プライマーの配列 (5'→3') |
|----------------|---|
| β -actin | forward: TGTGATGGTGGGAATGGGTCA (配列番号: 1) reverse: TTTGATGTCACGCACGATTTC (配列番号: 2) |
| IL-7 | forward: GTCACATCATCTGAGTGCCACA (配列番号: 3) reverse: GTAGTCTCTTTAGGAAACATGCATC (配列番号: 4) |
| IL-10 | forward: GTGAAGACTTTCTTTCAAACAAAG (配列番号: 5) reverse: CTGCTCCACTGCCTTGCTCTTATT (配列番号: 6) |
| IL-12p40 | forward: CGTGCTCATGGCTGGTGCAAAG (配列番号: 7) reverse: CTTTCATCTGCAAGTTCTTGGGC (配列番号: 8) |
| IFN- γ | forward: TACTGCCACGGCACAGTCATTGAA (配列番号: 9) reverse: GCAGCGACTCCTTTTCCGCTTCCT (配列番号: 10) |

PCR 反応液は 3%アガロースゲル電気泳動に供し、エチジウムブロマイド溶液による染色後、FAS-III フルシステム+DS30 (TOYOBO, Tokyo, Japan) で撮影した。

- 5 結果、リン酸化デキストランはマウス脾臓細胞から IL-10 および IFN- γ の mRNA 発現を誘導した (図 9)。

活性化された樹状細胞は IFN- γ を産生し、Th1 系の免疫応答を誘導することが知られている。また、IFN- γ は、自然免疫から獲得免疫の制御に至るまで、細胞間ネットワークにおける重要な液性因子として理解されている。一方、IL-10 は、

10 Th2 細胞から産生されるサイトカインとして知られ、マクロファージ存在下で Th1 細胞からのサイトカイン産生を抑制することが知られている。とくに、IFN- γ 産生に対する抑制効果は顕著である。

- Th1/Th2 系免疫応答は互いに抑制的に作用しており、このバランスが Th2 に偏るとアレルギー疾患、Th1 に偏ると大腸炎などの炎症反応が引き起こされると考えられている。IFN- γ の生理機能は抗ウイルス作用のみならず、様々な免疫調節機能を持つと考えられている。Steidler らは大腸炎の治療効果を有する IL-10 を
- 15 発現させた *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* を、大腸炎発症モデルマウスに経口投与することにより、炎症反応が有意に改善される事を報告している (Steidler,

L., Hans, W., Schotte, L., Neirynck, S., Obermeier, F., Falk, W., Fiers, W. and Remaut, E. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science*, 289, 1352-1355 (2000))。

この様に IFN- γ や IL-10 の個々の生理活性については様々であるが、リン酸化
5 デキストランの生体におけるサイトカインを介する免疫賦活化作用を考える場合、
その活性発現をサイトカインの相互作用として把握し、リン酸化デキストランの
効果を評価することができる。

〔実施例 9〕

10 (a) リン酸化デキストランの調製

文献 (Edward Tarelli and Susan F. Wheeler, Drying from phosphate-buffered solutions can result in the phosphorylation of primary and secondary alcohol groups of saccharides, hydroxylated amino acids, proteins and glycoproteins., *Analytical Biochemistry* 222, 196-201 (1994)) 記載のオルトリ
15 ン酸塩を用いたリン酸緩衝液についての情報を参考にして、デキストランのリン
酸化を実施した。まず、多糖試料 300mg を 0.1M リン酸緩衝液 (pH5.5) 10ml に懸
濁し、70℃に攪拌しながら加温し、完全に溶解するまで攪拌した。次に、試料溶
液を凍結乾燥し、その後、凍結乾燥試料を 140℃～160℃で 24 時間加熱した。

さらに、上記試料を 10mM 炭酸水素アンモニウム溶液 30ml に溶解し、10mM 炭
20 酸水素アンモニウム溶液に対して一晩透析後、50mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.6)
で 2 日間透析脱塩 (フリーのリン酸塩を完全に除くため) した。DEAE-Toyopearl
650M カラム (1.6 x 11cm) を用いてグラジエント溶出した。溶出液中の糖含量は、
フェノール硫酸法でモニターした。

25 (b) デキストランのリン酸化における至適温度条件の検討

上記実施例と同様の方法により、デキストランのリン酸化における至適温度条件を検討した。リン酸化反応は、80℃、100℃、120℃、140℃、160℃の加熱条件について行った。リン酸化未処理のデキストランを陰イオン交換クロマトグラフィーに供したところ、全て素通り画分に溶出した。

- 5 その結果、温度条件を上げるに伴い、カラム吸着性が向上し、リン酸化率が向上することが分かった（図10）。

更に、各加熱条件におけるデキストランのリン酸化効率を、上述の実施例3と同様の方法によってリン酸化デキストラン中のリン含量を測定し、至適温度条件を決定した。

- 10 その結果、140℃および160℃の条件で、リン含量が高値を示した（図11）。しかし、160℃では多少試料の褐変化が起こったが、リン酸基の導入率が5%を越える至適加熱時間は140℃～160℃であると考えられた。

（c）リン酸化デキストランのリンパ球幼若化活性

- 15 上記実施例記載の方法により得たリン酸化デキストランについて、マウス脾臓リンパ球に対する幼若化活性を、実施例5と同様の方法により測定した。ただし、リン酸化デキストランは、リン酸化反応温度を、それぞれ100、120、140、および160℃になるように設定したものを使用した。

- 20 その結果、リン酸化反応温度160℃のリン酸化デキストランが、最も高いS.I.を示しリンパ球幼若化活性を有することを確認した（図12）。

産業上の利用可能性

- 本発明により、リン酸化デキストランを有効成分として含む免疫賦活作用を有する薬剤が提供された。リン酸化デキストランは、B細胞マイトジェンであり、
25 樹状細胞を活性化し、さらにIL-10およびIFN- γ を誘導する活性を有することが

ら、本発明の薬剤は、感染症、アレルギー疾患または大腸炎の予防もしくは治療のための医薬品となるものと期待される。

- また、本発明のリン酸化デキストランは、樹状細胞などの抗原提示細胞を活性化させ、細胞の抗原提示能を亢進し、獲得免疫系を刺激する活性を有することが示された。加えて、B細胞を直接活性化する作用を有することから、本発明のリン酸化デキストランは、B細胞の抗体産生能を増強することにより、有効なアジュバントとして利用できるものと考えられる。

さらにリン酸化デキストランを含む組成物は、人間の健康維持・増進に寄与する免疫活性を持つ機能性の食品となるものと期待される。

- 10 また、本発明は、免疫活性発現におけるデキストラン中のリン酸基の重要性を証明するものであり、機能性の食品の開発のための基礎的データとして大変重要なものである。

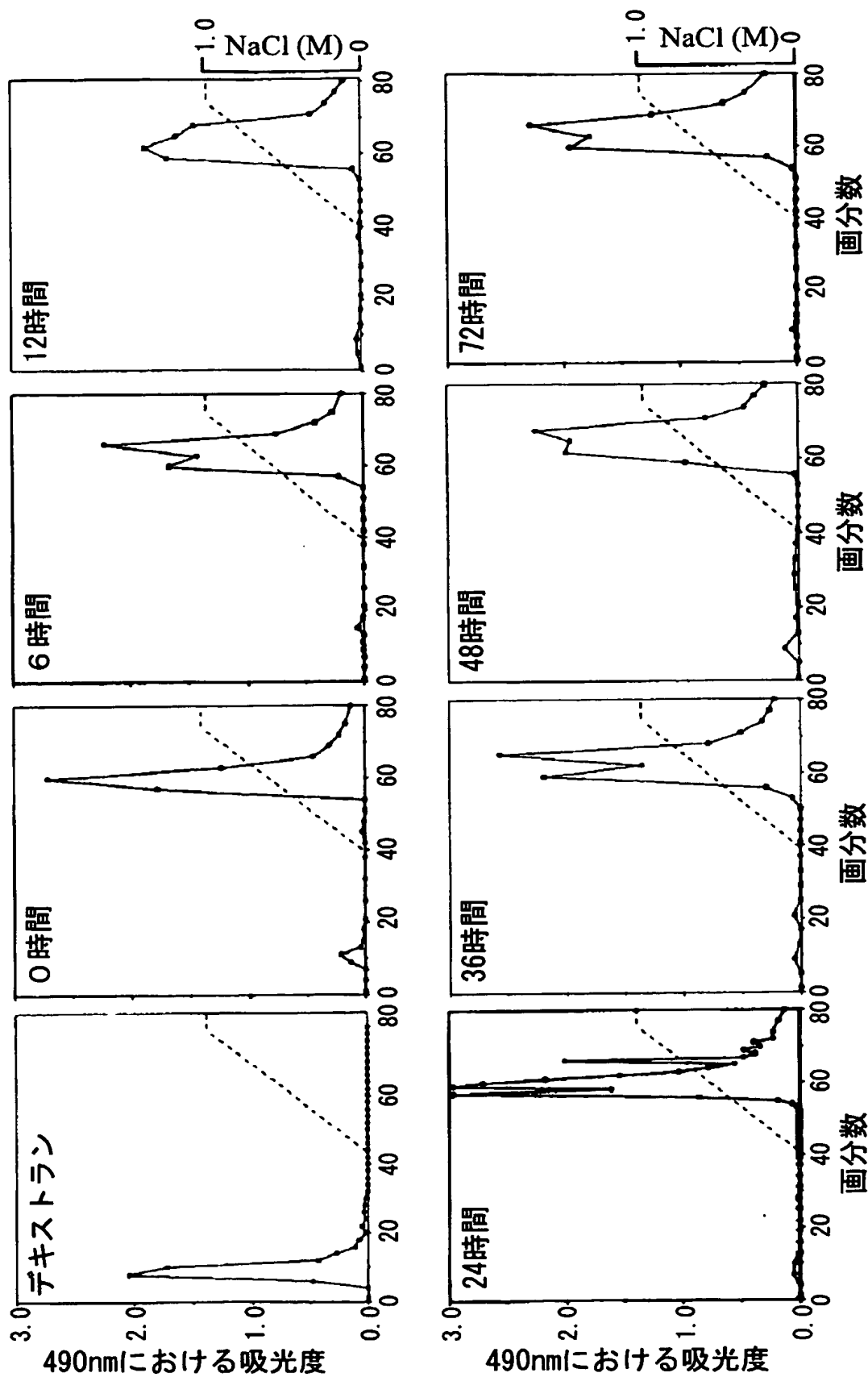
請求の範囲

1. リン酸化デキストランを有効成分として含む、免疫賦活作用を有する薬剤。
2. B細胞特異的マイトジェンである、請求項1に記載の薬剤。
- 5 3. 免疫賦活作用が幼若化作用である、請求項1に記載の薬剤。
4. 免疫賦活作用がインターフェロン γ (IFN- γ) またはインターロイキン 10 (IL-10) を誘導させる作用である、請求項1に記載の薬剤。
5. リン酸化デキストランを有効成分として含む、感染症、大腸炎、またはアレルギー疾患を、予防、改善または治療するための医薬組成物。
- 10 6. リン酸化デキストランを有効成分として含む、感染症、大腸炎、またはアレルギー疾患を、予防または改善するための食品組成物。
7. リン酸化デキストランと接触させることを特徴とする、細胞を免疫賦活化させる方法。
8. 免疫賦活化が幼若化である、請求項7に記載の方法。
- 15 9. 免疫賦活化がインターフェロン γ (IFN- γ) またはインターロイキン 10 (IL-10) の誘導化である、請求項7に記載の方法。
10. 細胞が脾臓細胞由来または樹状細胞由来である、請求項7～9のいずれかに記載の方法。
11. ホルムアルデヒド溶液中でデキストランとポリリン酸を反応させることを特徴とする、リン酸化デキストランの作製方法。
- 20 12. 加熱条件下においてデキストランとポリリン酸とを反応させる、請求項11に記載の方法。
13. リン酸化デキストランが、以下の工程(a)から(c)を含む方法によって作製されたものである、請求項5または6に記載の組成物。
- 25 (a) 加熱条件下においてデキストランとリン酸緩衝液とを反応させる工程、
(b) 工程(a)の反応液を凍結乾燥する工程、

- 28 -

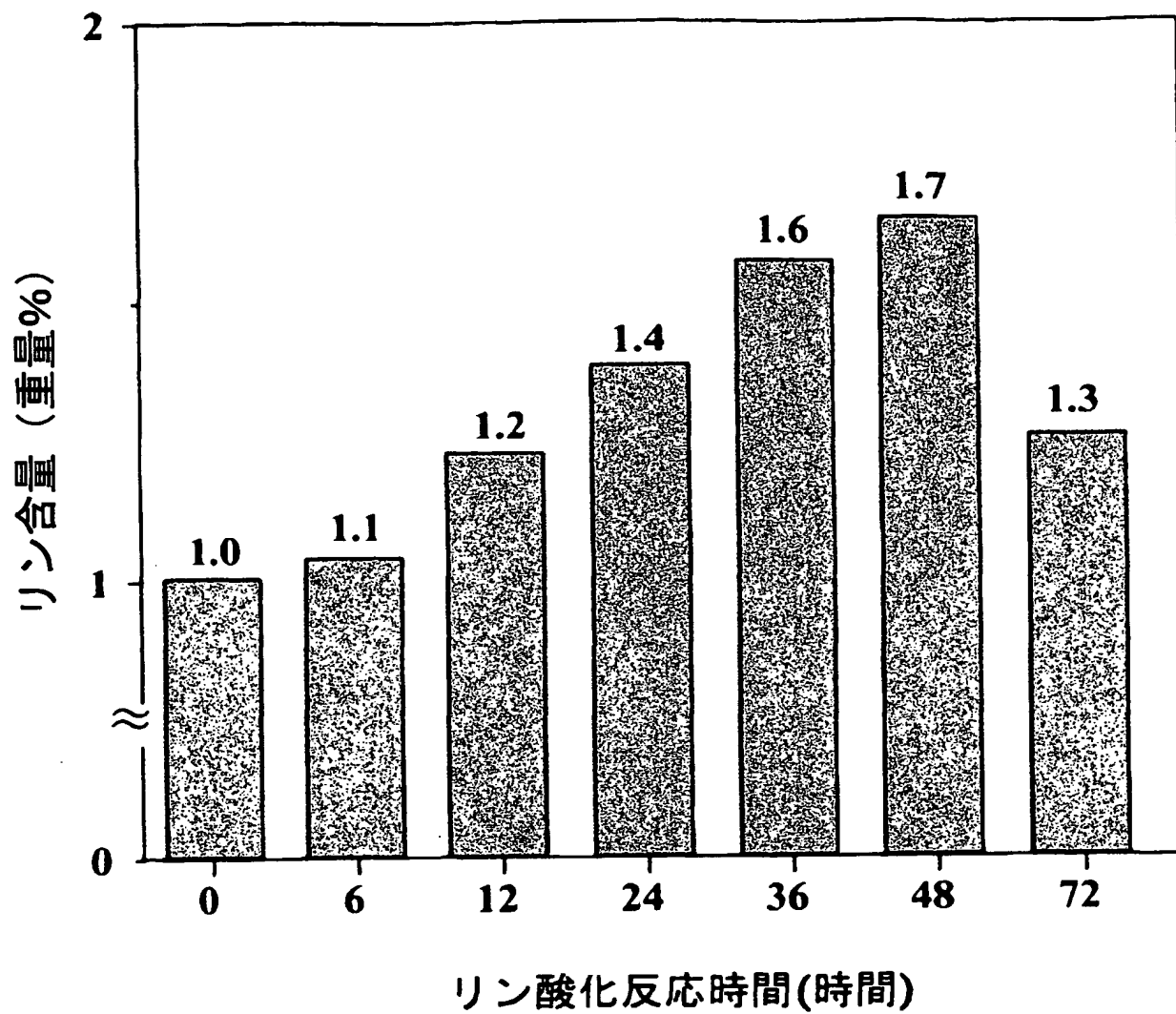
(c) 工程 (b) の凍結乾燥試料を 100～160℃で 24 時間、加熱する工程

図 1



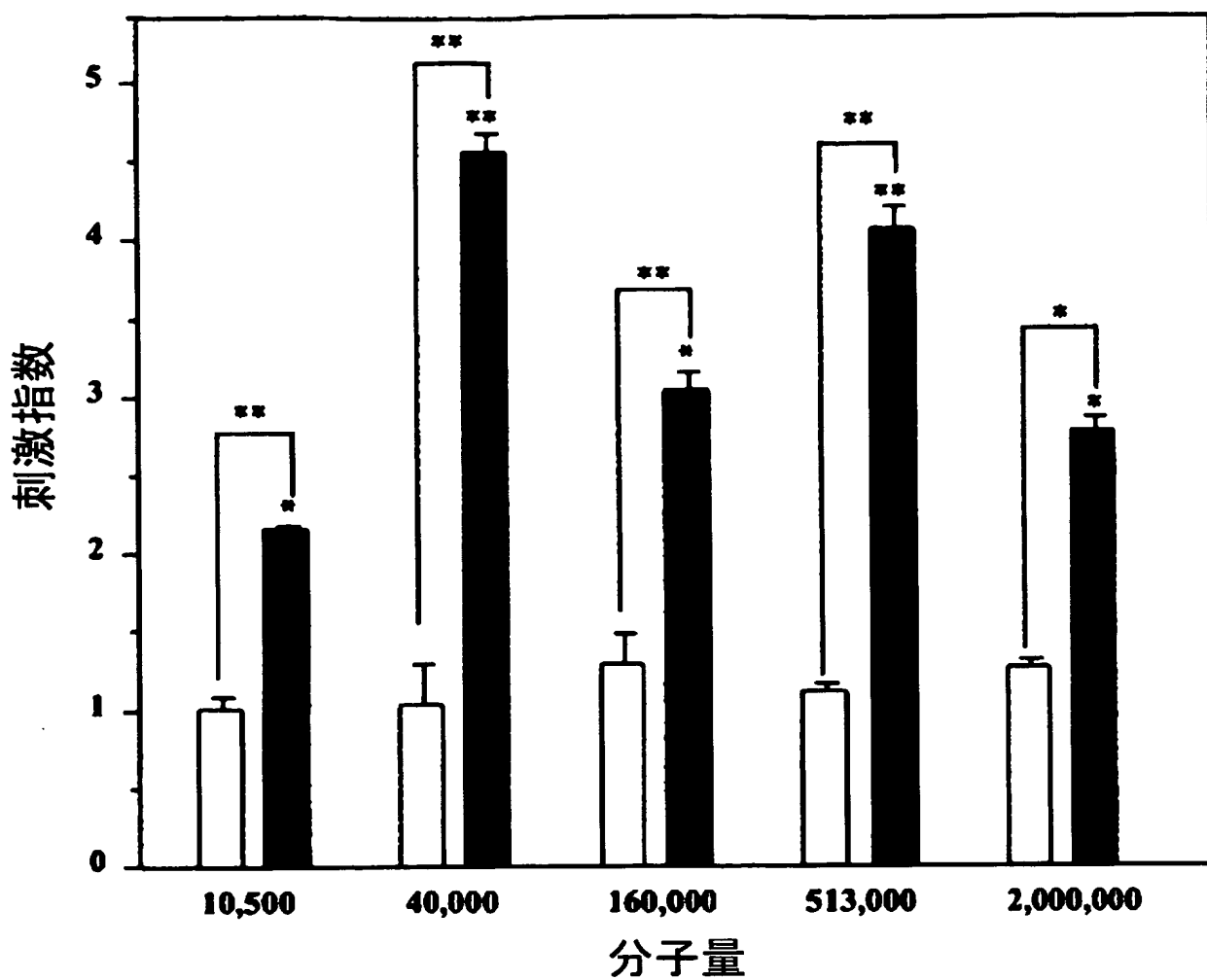
2 / 12

図 2



3 / 12

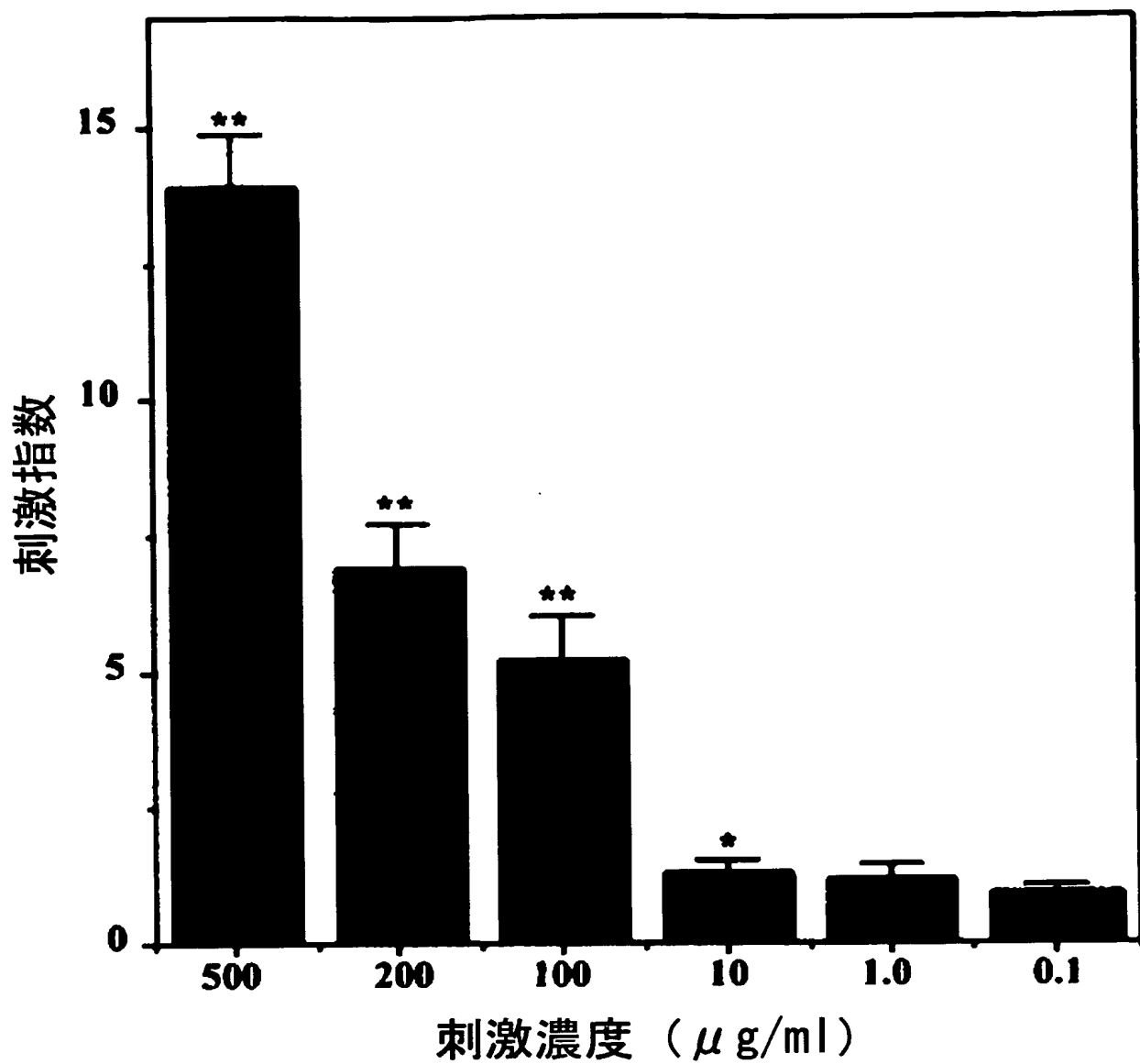
図 3



This Page Blank (uspto)

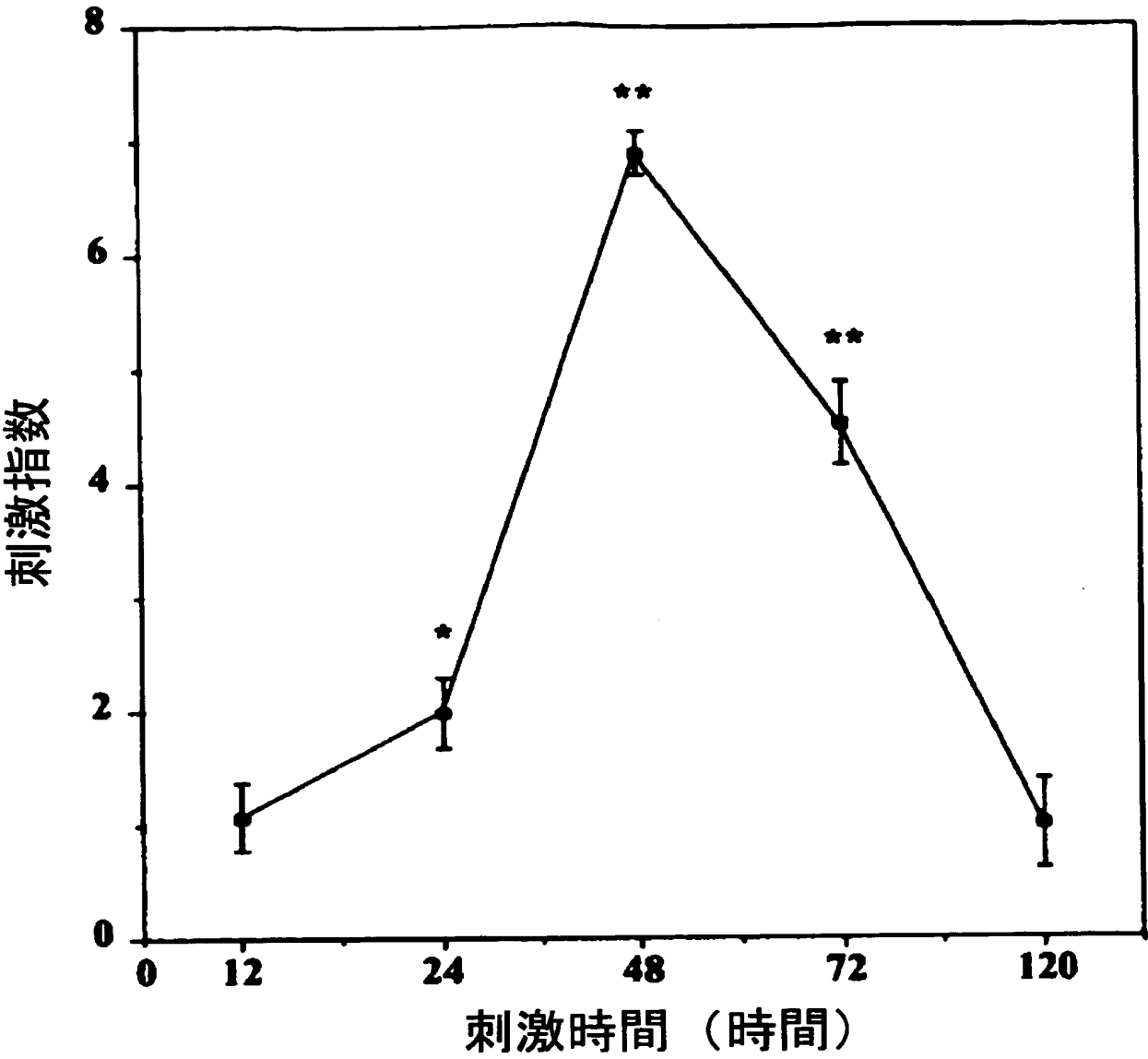
4 / 12

図 4



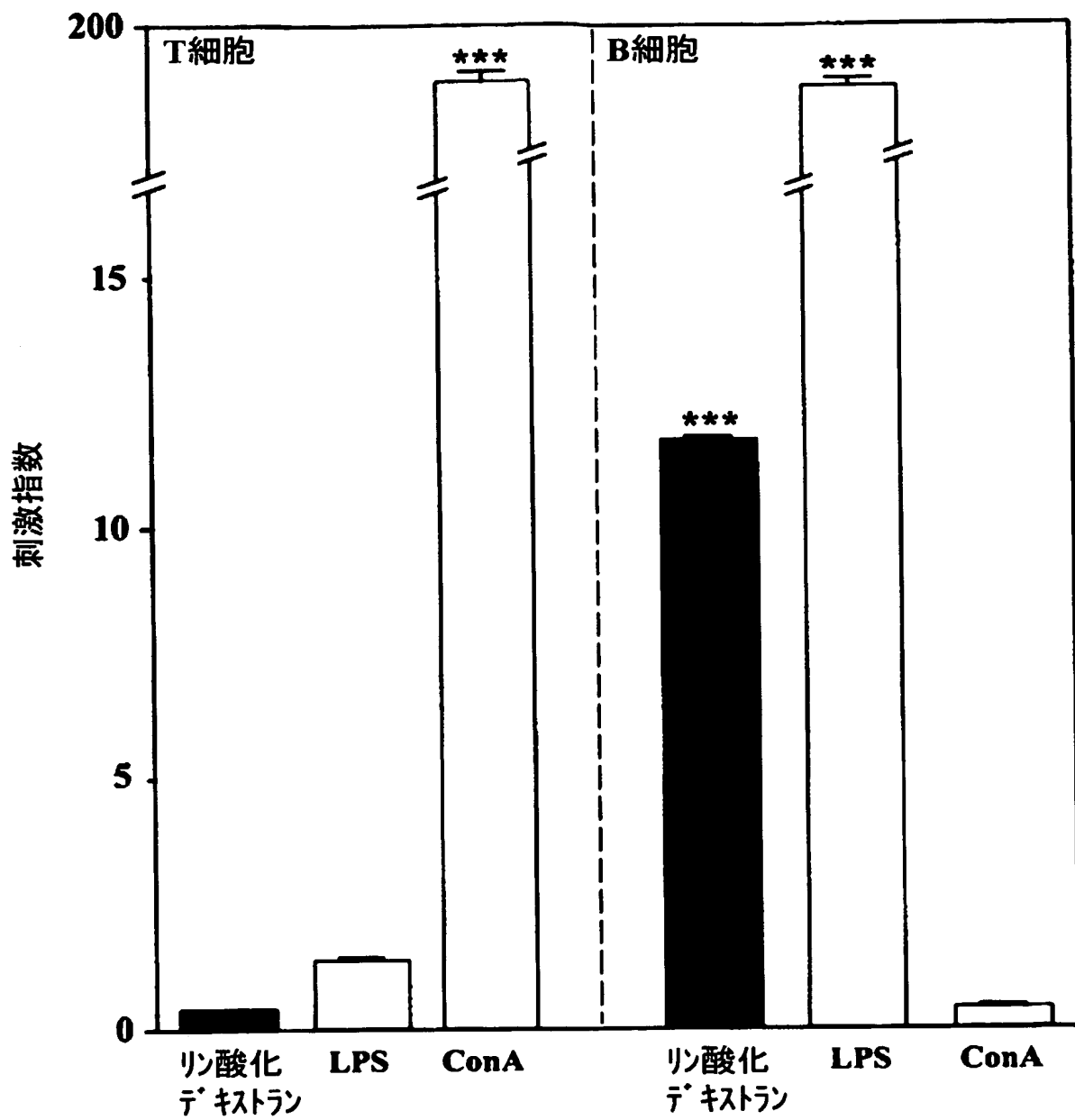
5 / 12

図 5



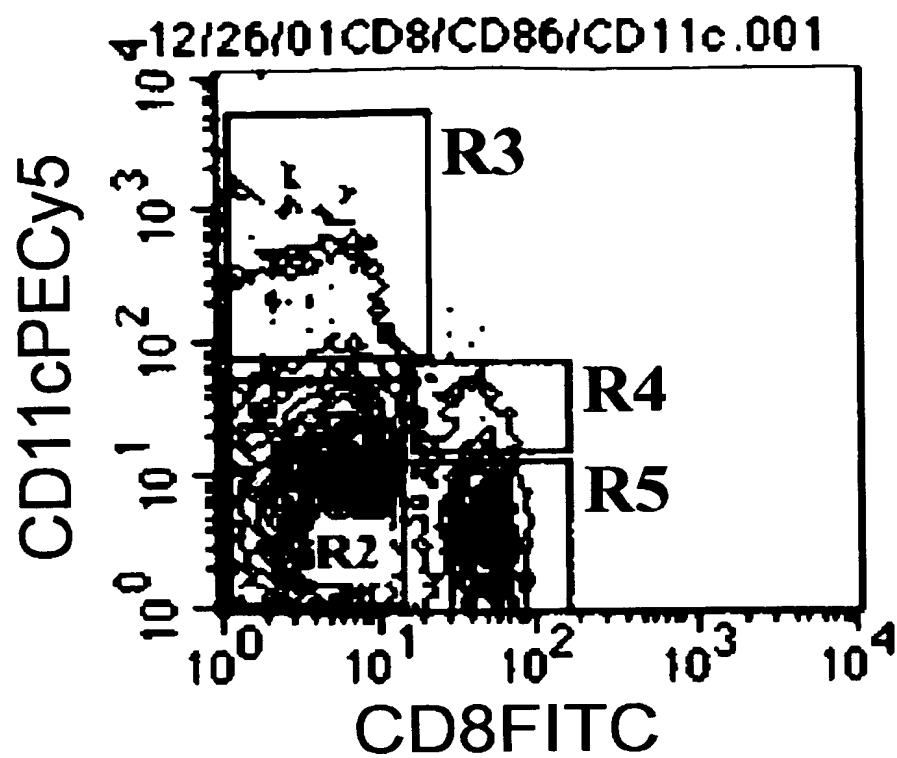
6 / 12

図 6



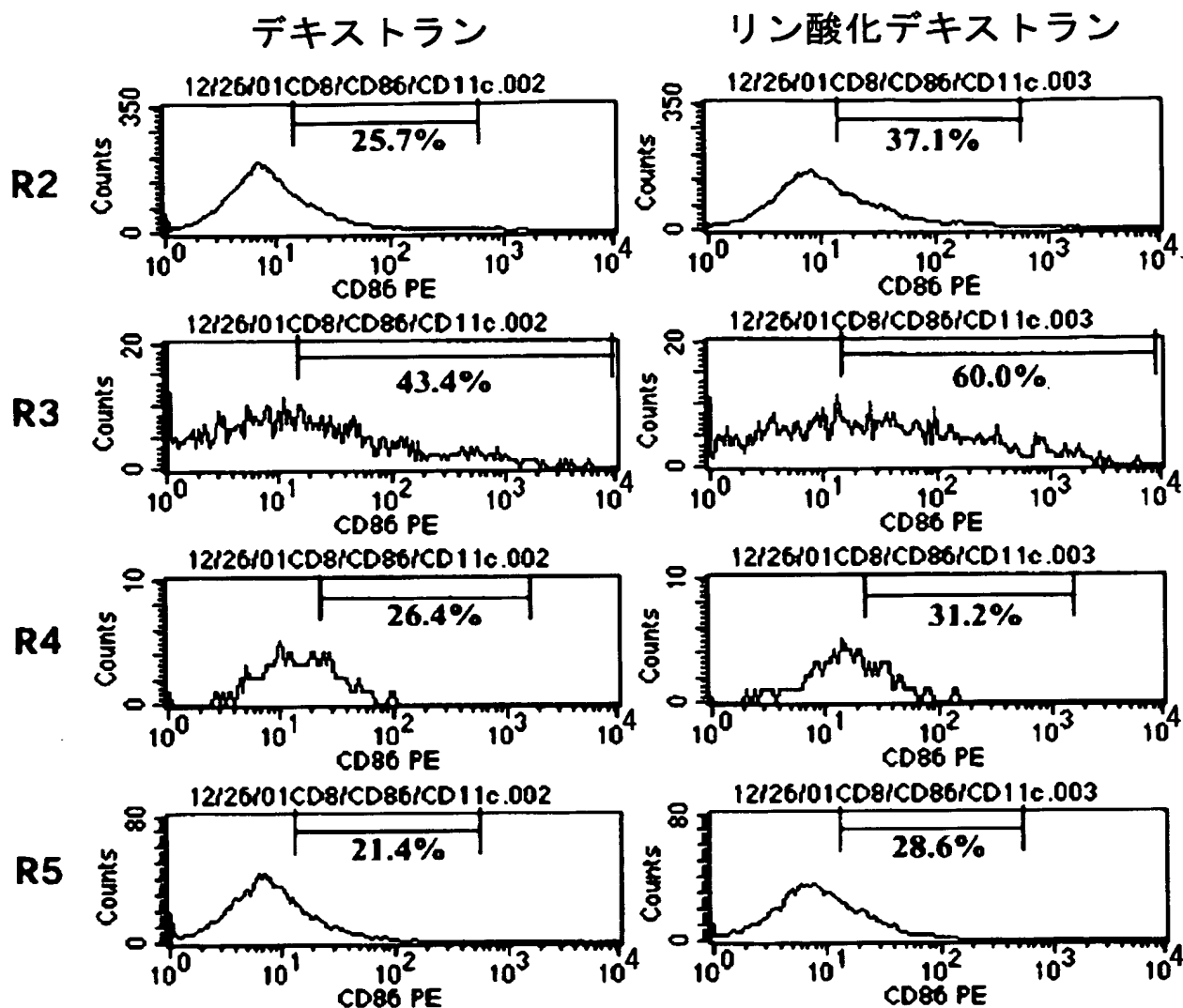
7 / 12

図 7



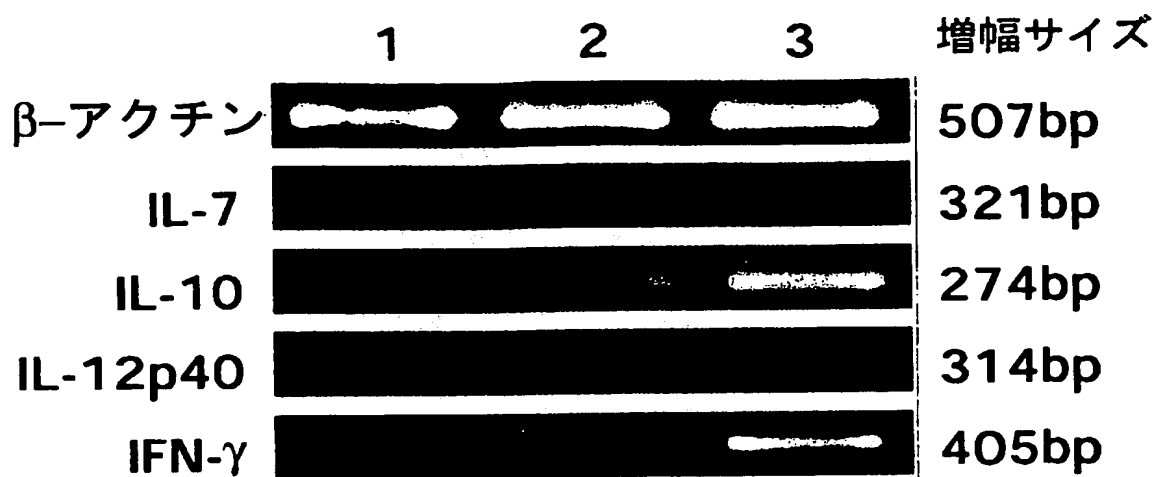
This Page Blank (uspto)

図 8



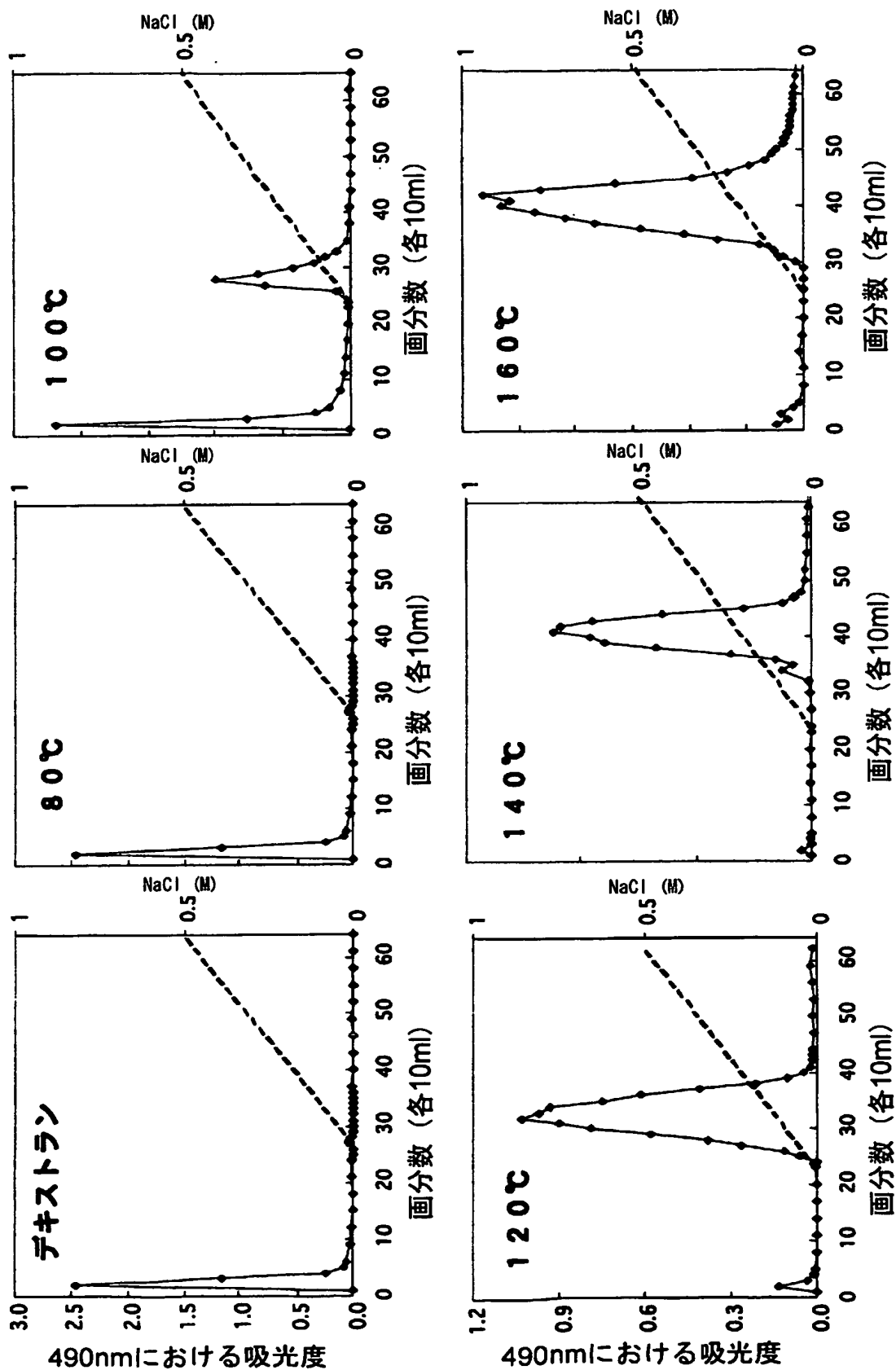
9 / 12

図 9



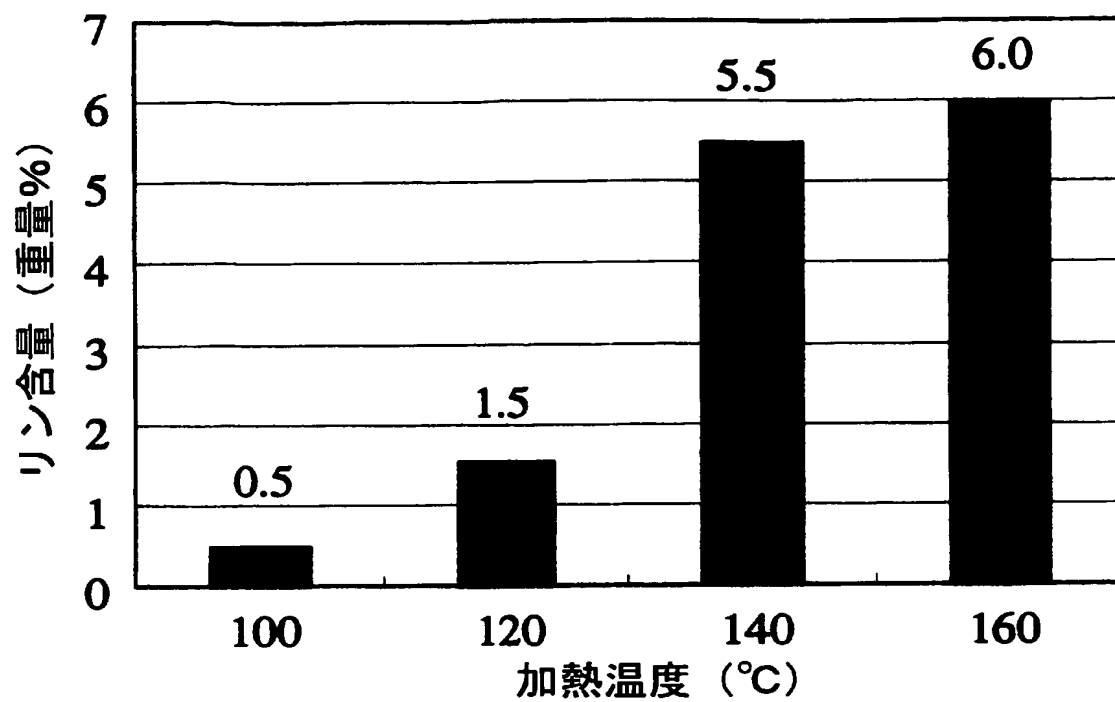
10/12

図 10



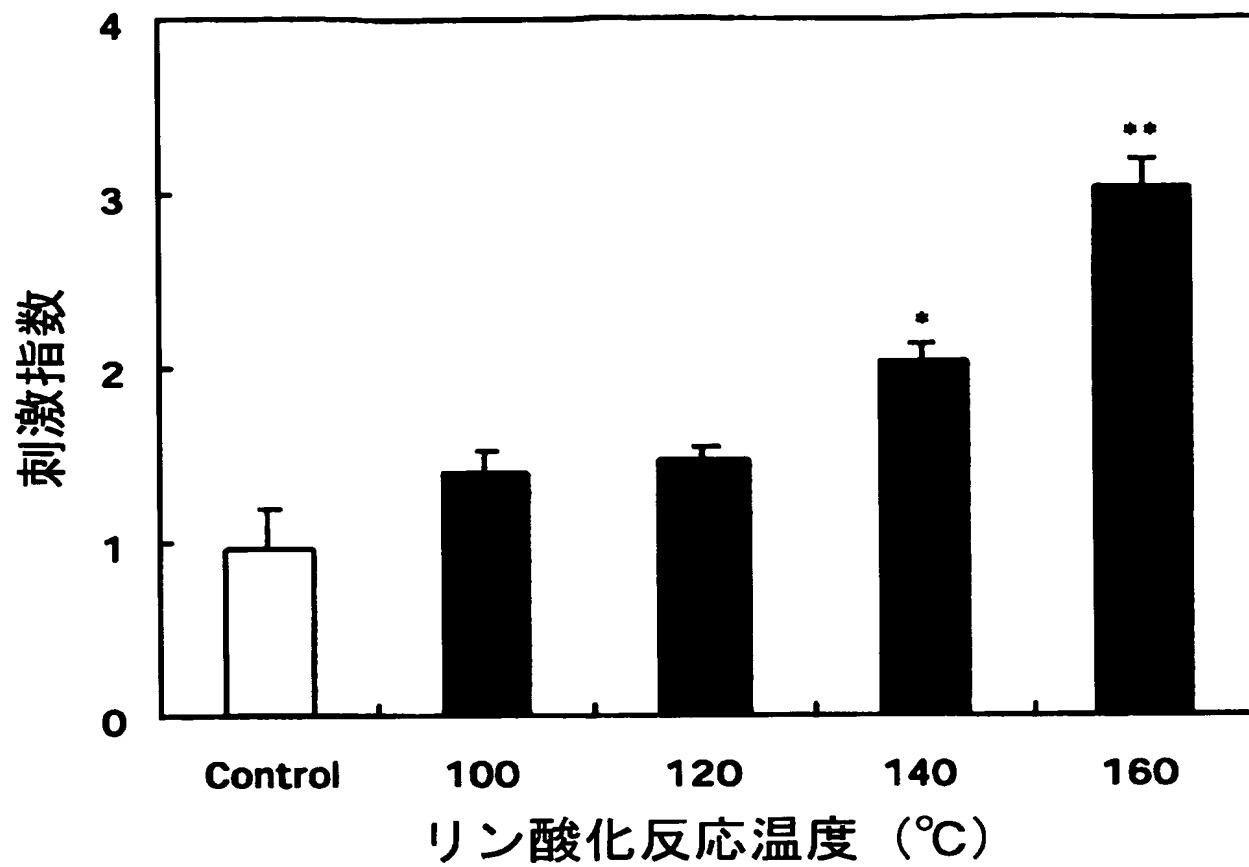
11 / 12

図 11



12 / 12

図 12



1 / 6

SEQUENCE LISTING

<110> MEIJI DAIRIES CORPORATION

<120> Dextran Phosphate

<130> M1-A0201Y1P

<140>

<141>

<150> JP 2002-213305

<151> 2002-07-23

<150> JP 2003-50739

<151> 2003-02-27

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

2 / 6

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 1

tgtgatggtg ggaatgggtc ag

22

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 2

tttgatgtca cgcacgattt cc

22

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

3 / 6

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 3

gtcacatcat ctgagtgcca ca

22

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 4

gtagtctctt taggaaacat gcatc

25

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

4 / 6

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 5

gtgaagactt tctttcaaac aaag

24

<210> 6

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 6

ctgctccact gccttgctct tatt

24

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

5 / 6

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 7

cgtgctcatg gctgggtgcaa ag

22

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 8

cttcatctgc aagttcttgg gc

22

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

6 / 6

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 9

tactgccacg gcacagtcac tgaa

24

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:an artificially
synthesized primer sequence

<400> 10

gcagcgactc cttttccgct tcct

24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/09324

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K31/721, A61P1/04, 31/00, 37/04, 37/08, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K31/721

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN), WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X | JP 51-41083 A (Shigeo SUZUKI), 06 April, 1976 (06.04.76), Full text (Family: none) | 1-6, 11-13 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
21 August, 2003 (21.08.03)

Date of mailing of the international search report
02 September, 2003 (02.09.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/09324

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 7-10
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions as set forth in claims 7 to 10 pertain to methods for treatment of the human body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A61K31/721, A61P1/04, 31/00, 37/04, 37/08, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. A61K31/721

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), REGISTRY (STN), WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| X | JP 51-41083 A (鈴木茂生) 1976. 04. 06, 文献全体 (ファミリーなし) | 1-6, 11-13 |

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21. 08. 03

国際調査報告の発送日

02.09.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内藤 伸一

4P

8615

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

第Ⅰ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 7-10 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

請求の範囲 7-10 の発明は、治療による人体の処置方法に関するものである。

2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅱ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。